

9/914870  
09/04/01



**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : <b>C12N 15/56, 9/14, 9/16, 9/24</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/52176</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. September 2000 (08.09.00)</p>																								
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP00/01853</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 3. März 2000 (03.03.00)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:  199 09 189.7      4. März 1999 (04.03.99)      DE  199 58 979.8      8. Dezember 1999 (08.12.99)      DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: <b>HARTMANN, Marcus</b>  [DE/DE]; Schlossplatz 5, D-48149 Münster (DE). <b>VOHLÉ, Peter</b> [-/DE]; An der Pulvermühle 29, D-51105 Köln (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und  (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>TIEDTKE, Arno</b> [DE/DE];  Schlossplatz 5, D-48149 Münster (DE). <b>BAUMERT, Uwe</b>  [DE/DE]; Ludwig-Thoma-Strasse 25, D-93051 Regensburg (DE).</p> <p>(74) Anwälte: <b>MEYERS, Hans-Wilhelm</b> usw.; Postfach 10 22 41,  D-50462 Köln (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Veröffentlicht</b>  <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>  <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP00/01853</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 3. März 2000 (03.03.00)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:  199 09 189.7      4. März 1999 (04.03.99)      DE  199 58 979.8      8. Dezember 1999 (08.12.99)      DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: <b>HARTMANN, Marcus</b>  [DE/DE]; Schlossplatz 5, D-48149 Münster (DE). <b>VOHLÉ, Peter</b> [-/DE]; An der Pulvermühle 29, D-51105 Köln (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und  (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>TIEDTKE, Arno</b> [DE/DE];  Schlossplatz 5, D-48149 Münster (DE). <b>BAUMERT, Uwe</b>  [DE/DE]; Ludwig-Thoma-Strasse 25, D-93051 Regensburg (DE).</p> <p>(74) Anwälte: <b>MEYERS, Hans-Wilhelm</b> usw.; Postfach 10 22 41,  D-50462 Köln (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Veröffentlicht</b>  <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>  <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>																						
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP00/01853</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 3. März 2000 (03.03.00)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:  199 09 189.7      4. März 1999 (04.03.99)      DE  199 58 979.8      8. Dezember 1999 (08.12.99)      DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: <b>HARTMANN, Marcus</b>  [DE/DE]; Schlossplatz 5, D-48149 Münster (DE). <b>VOHLÉ, Peter</b> [-/DE]; An der Pulvermühle 29, D-51105 Köln (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und  (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>TIEDTKE, Arno</b> [DE/DE];  Schlossplatz 5, D-48149 Münster (DE). <b>BAUMERT, Uwe</b>  [DE/DE]; Ludwig-Thoma-Strasse 25, D-93051 Regensburg (DE).</p> <p>(74) Anwälte: <b>MEYERS, Hans-Wilhelm</b> usw.; Postfach 10 22 41,  D-50462 Köln (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Veröffentlicht</b>  <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>  <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>																									
<p>(54) Title: <b><math>\beta</math>-HEXOSAMINIDASE, DNA SEQUENCE FROM CILIATES FOR CODING THE SAME AND USE THEREOF</b></p> <p>(54) Bezeichnung: <b><math>\beta</math>-HEXOSAMINIDASE SOWIE DIESE KODIERENDE DNA-SEQUENZ AUS CILIATEN UND DEREN VERWENDUNG</b></p> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;"> <p>Die Aminosäure-Sequenz einer sauren Hydrolase aus dem Ciliaten <i>Tetrahymena</i>:</p> <p>THE AMINO ACID SEQUENCE OF AN ACIDIC HYDROLASE FROM THE CILIATE TETREHYMENA</p> <table style="margin: auto; border: none;"> <tr><td style="padding-right: 20px;">MQKILLITFL LGIALAQITP GVDPISAKVM PKPKNYTYGD LSLVTDPCG</td><td style="text-align: right;">50</td></tr> <tr><td>VSYRPSVSGG KVPNHVYQII GFYTLNIFNS NENSCAMQR EYKNETTIEK</td><td style="text-align: right;">100</td></tr> <tr><td>MRRLQHSQNI VFDIFIQDAA LATADTLEDE YYDLQIYNTT YWKLTANKYV</td><td style="text-align: right;">150</td></tr> <tr><td>GLLRGLETYS QLFTQDEDETE DWYLNINIPIS IQDQPDYIYR GLMIDSAHF</td><td style="text-align: right;">200</td></tr> <tr><td>LSVETILKTI DSMLFNKLVN LHWITDTES FPFPLKSPFN ITKYGAYSKK</td><td style="text-align: right;">250</td></tr> <tr><td>KQYSFEDIQY IVDQALNKG I QVIPEVDS PG HAFSWARSPQ FSSIGLLCDQ</td><td style="text-align: right;">300</td></tr> <tr><td>YNGQLDPTLN LTYTAVKGIM EDMNTQFYTA KYVHFGGDEVEEQCWNKRPE</td><td style="text-align: right;">350</td></tr> <tr><td>IKFPMNQNNI STYTDLQNY Y RKNQVNIWKS INATKPAIFW ADSNTLKYGP</td><td style="text-align: right;">400</td></tr> <tr><td>DDIIQWWGST HDFSSIKDLP NKILSFYDN TYLDVGEGRN YGGSYGSMYN</td><td style="text-align: right;">450</td></tr> <tr><td>WDLNSFNPRVPGIKGELG ETCLWSEMN DDSTQFQLW TRNSAFAERL</td><td style="text-align: right;">500</td></tr> <tr><td>WNTDAANNET YKTRALVSRM VFMQHRLTAR GIPASPTVVG ICEQNLSLCY</td><td style="text-align: right;">550</td></tr> <tr><td>N</td><td style="text-align: right;">551</td></tr> </table> </div>			MQKILLITFL LGIALAQITP GVDPISAKVM PKPKNYTYGD LSLVTDPCG	50	VSYRPSVSGG KVPNHVYQII GFYTLNIFNS NENSCAMQR EYKNETTIEK	100	MRRLQHSQNI VFDIFIQDAA LATADTLEDE YYDLQIYNTT YWKLTANKYV	150	GLLRGLETYS QLFTQDEDETE DWYLNINIPIS IQDQPDYIYR GLMIDSAHF	200	LSVETILKTI DSMLFNKLVN LHWITDTES FPFPLKSPFN ITKYGAYSKK	250	KQYSFEDIQY IVDQALNKG I QVIPEVDS PG HAFSWARSPQ FSSIGLLCDQ	300	YNGQLDPTLN LTYTAVKGIM EDMNTQFYTA KYVHFGGDEVEEQCWNKRPE	350	IKFPMNQNNI STYTDLQNY Y RKNQVNIWKS INATKPAIFW ADSNTLKYGP	400	DDIIQWWGST HDFSSIKDLP NKILSFYDN TYLDVGEGRN YGGSYGSMYN	450	WDLNSFNPRVPGIKGELG ETCLWSEMN DDSTQFQLW TRNSAFAERL	500	WNTDAANNET YKTRALVSRM VFMQHRLTAR GIPASPTVVG ICEQNLSLCY	550	N	551
MQKILLITFL LGIALAQITP GVDPISAKVM PKPKNYTYGD LSLVTDPCG	50																									
VSYRPSVSGG KVPNHVYQII GFYTLNIFNS NENSCAMQR EYKNETTIEK	100																									
MRRLQHSQNI VFDIFIQDAA LATADTLEDE YYDLQIYNTT YWKLTANKYV	150																									
GLLRGLETYS QLFTQDEDETE DWYLNINIPIS IQDQPDYIYR GLMIDSAHF	200																									
LSVETILKTI DSMLFNKLVN LHWITDTES FPFPLKSPFN ITKYGAYSKK	250																									
KQYSFEDIQY IVDQALNKG I QVIPEVDS PG HAFSWARSPQ FSSIGLLCDQ	300																									
YNGQLDPTLN LTYTAVKGIM EDMNTQFYTA KYVHFGGDEVEEQCWNKRPE	350																									
IKFPMNQNNI STYTDLQNY Y RKNQVNIWKS INATKPAIFW ADSNTLKYGP	400																									
DDIIQWWGST HDFSSIKDLP NKILSFYDN TYLDVGEGRN YGGSYGSMYN	450																									
WDLNSFNPRVPGIKGELG ETCLWSEMN DDSTQFQLW TRNSAFAERL	500																									
WNTDAANNET YKTRALVSRM VFMQHRLTAR GIPASPTVVG ICEQNLSLCY	550																									
N	551																									
<p>(57) Abstract</p> <p style="margin-left: 40px;">Nucleic acid that codes <math>\beta</math>-Hexosaminidase from ciliates.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p style="margin-left: 40px;">Nucleinsäure kodierend für eine <math>\beta</math>-Hexosaminidase aus Ciliaten.</p>																										

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**$\beta$ -Hexosaminidase sowie diese kodierende DNA-Sequenz aus  
Ciliaten und deren Verwendung**

Die Erfindung betrifft eine Nucleinsäure kodierend für eine  $\beta$ -Hexosaminidase.

Die Expression von Fremdproteinen in Mikroorganismen, wie Bakterien, Hefen, oder Mammalia-Zellen ist für die biotechnologische Darstellung und Produktion rekombinanter Proteine von großer Bedeutung. Hierbei werden bakterielle Expressionssysteme auf der Basis von *E. coli* oder *B. subtilis* zur Produktion von rekombinanten Peptiden bzw. Proteinen wie z.B. Insulin, Interleukin-2, Gewebe-Plasminogen-Aktivator, Proteasen und Lipasen verwendet. Bei gram-negativen Bakterien basieren die Expressionssysteme meist auf der Verwendung von genetischen Elementen, wie dem lac-Operon oder dem Tryptophan-Operon. Dabei werden die wirtsfremden Proteine entweder in "inclusion bodies" (Einschlusskörper) innerhalb der Zelle produziert, oder, bei Verwendung von Expressionssystemen auf der Basis von  $\beta$ -Lactamase-Genen, in den periplasmatischen Raum. Die Produktion von rekombinanten Proteinen in das umgebende Fermentationsmedium ist nicht etabliert. Bei gram-positiven Bakterien werden bisher fast ausschließlich nur zelleigene Proteine in Expressionssysteme eingebaut und expremiert.

Hefen, wie *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* oder *Pichia pastoris*

- 2 -

werden ebenfalls zur heterologen Expression rekombinanter Proteine, wie z.B. von humanem Faktor XIIIa, bovinem Pro-Chymosin oder Oberflächenantigenen eingesetzt. Die Expressionssysteme basieren hier auf Shuttle-Vektoren (Vektor mit einem Hefe- und einem bakteriellen Anteil), die auf den genetischen Elementen der Galakto-Kinase-Epimerase, der sauren Phosphatase oder Alkoholdehydrogenase aufgebaut sind. In der Regel wird das rekombinante Protein in das Cytoplasma der Zelle produziert. Bei Verwendung von hefeeigenen Signalsequenzen, wie der des Alpha-Faktors, können die exprimierten Proteine auch in das Fermentationsmedium sezerniert werden. Die Glykosylierung sezernierter Proteine erfolgt nach dem "high-mannose"-Typ.

Mammalia-Zellen, wie verschiedene Zelltypen von Nagern (CHO-Zellen, C127-Zellen) oder Affen (Vero-, CV-1- oder COS-Zellen) kommen ebenfalls zur heterologen Expression rekombinanter Proteine zum Einsatz. Die Expressionssysteme basieren hier auf rekombinanten Viren (BPV-Vektor) oder auf Shuttle-Vektoren. Zur Regulation der Expression werden virale SV40-Enhancer/Promotor-Systeme oder zelluläre Verstärker-Elemente eingesetzt. Die rekombinanten Proteine, wie Erythropoietin, werden in das Fermentationsmedium sezerniert, da die Fremdgene in der Regel bereits Signalsequenzen mitbringen und diese vom Expressionssystem verstanden und zur Zielsteuerung verwendet werden.

Zur biotechnologischen Produktion von glykosylierten, extrazellulären Enzymen werden des weiteren Ciliaten wie beispielsweise *Tetrahymena* eingesetzt. Ciliaten wachsen auf kostengünstigen Fermentationsmedien unter Einsatz von Standardfermentationsverfahren. Zur Transformation solcher Ciliaten stehen Vektoren zur Verfügung, die auf den rDNA-Elementen des Ciliaten *Tetrahymena* basieren. Zur heterologen

- 3 -

Expression von bakteriellen Proteinen in Ciliaten werden DNA-Konstrukte aus Genen von *Tetrahymena* eingesetzt. Wenn geeignete genetische Elemente zur Regulation der Transkription, der Zielsteuerung und der Glykosylierung von Fremdproteinen zur Verfügung stehen, sind Ciliaten ein ideales Expressionssystem zur kostengünstigen Produktion therapeutischer rekombinanter Proteine.

Die bisher verwendeten Gram negativen bakteriellen Expressionssysteme führen in der Regel zur Bildung von "inclusion bodies" in der Zelle, einhergehend mit einer Denaturierung der Proteine. Für die Gewinnung des rekombinanten Proteins müssen die Zellen aufgebrochen und das denaturierte, inaktive Protein für seine Funktion zurückgefaltet werden. Dies verursacht zusätzliche kostenintensive Verfahrensschritte und erniedrigt die Ausbeute des erwünschten Proteins. Die für eukaryontische Proteine wichtige Glykosylierung unterbleibt völlig. Bei der Verwendung von Gram-positiven bakteriellen Expressionssystemen ist der Abbau des Zielproteins durch hohe proteolytische Aktivitäten in der Fermentationsbrühe zudem problematisch.

Bei der Verwendung von Hefen zur heterologen Expression wird das erwünschte Zielprotein häufig nur in die Zelle produziert, aus der es durch Zellaufschluss entfernt werden muss. Dies verursacht, wie bei bakteriellen Expressionssystemen, zusätzliche zeit- und kostenintensive Verfahrensschritte. Werden hefeeigene Signalpeptide verwendet, so werden die Fremdproteine bei der Sezernierung nicht korrekt gespleißt und glykosyliert.

Werden hingegen Mammalia-Zellsysteme zur Produktion von rekombinanten Proteinen eingesetzt, so liegen die erwünschten Proteine extrazellulär, korrekt gespleißt und glykosyliert im Fermentationsmedium vor. Nachteilig ist hier jedoch zum einen die

- 4 -

niedrige Expressionsrate durch die fehlerhafte Prozessierung und ineffiziente Translation von Genen, die über virale Vektoren in das Genom der Produktionszelllinie eingebracht wurden. Zum anderen sind die serumhaltigen Fermentationsmedien für Mammalia-Zellen extrem kostenintensiv. Zudem ist die Fermentationstechnologie für die scherkraftempfindlichen Zelllinien auf Grund von Konstruktionen zur blasenfreien Belüftung aufwendig und ebenfalls kostspielig. Weitere Probleme ergeben sich durch die hohe Gefahr der Infektion der Zelllinien durch Mycoplasmen und Viren. Zusammengenommen hat die Verwendung von Mammalia-Zellen zur biotechnologischen Herstellung von rekombinanten Proteinen sehr hohe Kosten, Sicherheitsauflagen und niedrige Ausbeuten zur Folge.

Für den Einsatz von Ciliaten, wie *Tetrahymena*, gelten die oben genannten Nachteile bei der Produktion von Proteinen nicht. So werden beispielsweise einige saure Hydrolasen, die an der Verdauung von Nahrungspartikeln beteiligt sind, in großen Mengen und komplex glykosiliert aus der Zelle ausgeschleust.

Alam et al. beschreiben im J. Euk. Mikrobiol. 43 (4), 1996, Seiten 295 bis 303 die Klonierung eines Gens, das für die saure  $\alpha$ -Glucosidase von *Tetrahymena pyriformis* kodiert. Das Protein wird jedoch nur zu einem geringen Teil aus der Zelle ausgeschleust.

Bisher ist es jedoch nicht möglich, andere, fremde glykosylierte eukaryontische Proteine in Ciliaten zur Expression zu bringen, die gleichfalls in das Fermentationsmedium sezerniert werden. Ursache ist, dass bisher die DNA-Sequenzen aus Ciliaten eigenen sezernierten sauren Hydrolasen unbekannt waren, die für die Konstruktion von Expressionsvektoren notwendig sind.

- 5 -

Aufgabe der Erfindung ist es, eine DNA-Sequenz zur Expression von sezernierten Proteinen von Ciliaten bereitzustellen. Die DNA-Sequenz soll es ermöglichen, in einem Expressionssystem heterologe Proteine nach der Transformation in Ciliaten in das Fermentationsmedium zu verbringen. Dieses System soll auch eine hohe Expressionsrate des heterologen Proteins erreichen, das unter Kulturbedingungen in großen Mengen aus der Zelle ausgeschleust wird.

Diese Aufgabe wird durch ein System gelöst, bei dem eine Nucleinsäure mit einer Sequenz mit der Seq. ID. Nr. 1 codierend für  $\beta$ -Hexosaminidase Verwendung findet.

Die erfindungsgemäße DNA-Sequenz der  $\beta$ -Hexosaminidase beinhaltet insbesondere ein Signal- und ein Propeptid, sowie gegebenenfalls weitere genetische Elemente zur Zielsteuerung von Proteinen. Die Verwendung dieser Sequenzen in einem Vektor ermöglicht es, heterolog exprimierte Proteine aus der Zelle zu transportieren und damit ohne Zellaufschluß aus Fermentationsbrühe aufzureinigen.

Figur 1 zeigt eine Nucleinsäure kodierend für  $\beta$ -Hexosaminidase aus Ciliaten. Figur 2 zeigt ein entsprechendes Expressionsprodukt der Nucleinsäure gemäß Seq. ID. Nr. 1. Dieses Protein gemäß Seq. ID. Nr. 2 ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Gegenstand der Erfindung ist insbesondere die Signalsequenz des erfindungsgemäßen Proteins. Es handelt sich dabei bevorzugt um die Aminosäuren 1 bis 17 des erfindungsgemäßen Proteins. Auch eine Nucleinsäure, die für das N-terminale Fragment kodiert, ist Gegenstand der Erfindung. Es handelt sich dabei bevorzugt um ein Fragment der erfindungsgemäßen Nucleinsäuren, insbesondere mit der Nucleinsäuresequenz 1 bis 51 gemäß der Figur 1.

- 6 -

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung einer Nucleinsäuresequenz von sauren Hydrolasen gemäß der Erfindung oder Teilen davon zur homologen oder heterologen Expression von rekombinanten Proteinen und Peptiden, sowie zur homologen oder heterologen Rekombination ("knock-out", "gene replacement").

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren, bei dem die für  $\beta$ -Hexosaminidase kodierende erfindungsgemäße Nucleinsäure oder Teile davon mit den für homologe oder heterologe Expression üblichen Enhancer, Promotoren, Operatoren, Origins, Terminatoren, Antibiotikaresistenzen oder anderen Nucleinsäuren bzw. DNA-Fragmenten bzw. Sequenzen jeglicher Art von Viroiden, Viren, Bakterien, Archezoen, Protozoen, Pilzen, Pflanzen, Tieren oder Menschen kombiniert werden.

Insbesondere wird die erfindungsgemäße Nucleinsäure oder Teile davon in einen Vektor, ein Plasmid, ein Cosmid, ein Chromosom oder Minichromosom, ein Transposon, ein IS-Element, eine rDNA oder jede andere Art ringförmiger oder linearer DNA oder RNA eingebaut.

Dem Fachmann ist klar, dass erfindungsgemäß auch Nucleinsäuren eingesetzt werden können, die zu mindestens 40% homolog mit der Nucleinsäure gemäß Seq. ID. Nr. 1 ist. Auch das Protein gemäß Seq. ID. Nr. 2 kann modifiziert werden ohne die Funktion zu verlieren. So können beispielsweise sogenannte konservative Austausche von Aminosäuren durchgeführt werden. Dazu können z.B. hydrophobe Aminosäuren untereinander ausgetauscht werden.

Zur Aufreinigung und Isolierung  $\beta$ -Hexosaminidase aus Ciliaten und zur Bestimmung der Sequenz können folgende Methoden verwendet werden. Dies wird an den folgenden Beispielen verdeutlicht.



Beispiel 1

Aus insgesamt 3,2 L Zellkultur wurden Zellen des Ciliaten *Tetrahymena* der spätlogarithmischen Wachstumsphase in 400 mL Hungermedium (10 mM TRIS-HCl, pH 7,4) hineingewaschen und die Zellen unter Schütteln weitere 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der zellfreie Kulturüberstand geerntet und durch eine Reihe Filter mit abnehmendem Porendurchmesser filtriert, um eventuell vorhandenes partikuläres Material zu entfernen. Das Filtrat wurde mit einer Amicon-Ultrafiltrationszelle eingeeengt und in den Startpuffer für die anschließende Ionenaustausch-Chromatographie (IEC) umgepuffert.

Die aufgefangenen Chromatographie-Fraktionen wurden mit spezifischen 4-Nitro-phenyl-Substraten für saure Hydrolasen, der saure Phosphatase (sPase) und der  $\beta$ -Hexosaminidase ( $\beta$ -Hex), getestet und die Fraktionen mit der höchsten  $\beta$ -Hex-Aktivität vereinigt. Diese wurden durch eine weitere Amicon-Ultrafiltration eingeeengt und in den Startpuffer für die Affinitäts-Chromatographie umgepuffert. Die aufgefangenen Chromatographie-Fraktionen wurden, wie oben beschrieben, auf Enzymaktivitäten getestet, die Fraktionen mit der höchsten Aktivität für eine saure Hydrolase vereinigt und in Phosphat-Puffer (PB) umgepuffert. Aus insgesamt acht Aufreinigungen wurden die hydrolase-haltigen Chromatographie-Fraktionen zusammengefasst, eingeeengt, portioniert und bis zur weiteren Charakterisierung eingefroren.

Ein Teil dieser so aufgereinigten Hydrolase wurde über 2D-SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (insgesamt acht Gele), der Hauptspot jeweils ausgestochen und gesammelt. Das in diesen Gelstücken vorhandene Protein, die  $\beta$ -Hex, wurde mit der Protease Trypsin verdaut. Die so entstandenen Peptid-Fragmente wurden aus den Gelstückchen

- 8 -

herausgelöst und über Reverse-Phase-HPLC (RP-HPLC) voneinander getrennt. Die Reinheit der HPLC-Fraktionen wurde mit einem massenspektroskopischen Verfahren (MALDI-MS) überprüft und die sauberen, d.h. die Fraktionen, die nur eine Peptid-Spezies einer definierten Masse enthielten, über Edman-Abbau von ihrem N-Terminus her sequenziert.

Anhand der Sequenz der Peptidfragmente, die durch den Trypsin-Verdau gewonnen wurden, wurden  $\beta$ -Hexosaminidase-spezifische PCR-Primer erstellt. Durch Sequenz-Vergleich mit den bereits vorhandenen  $\beta$ -Hex-Sequenzen konnte eine Vorauswahl der Primer-Kombinationen für die RT-PCR getroffen werden. Mit diesen Informationen wurde mittels RT-PCR aus isolierter Gesamt-RNA, deren Qualität vorher durch Northern-Hybridisierung überprüft wurde, erste spezifische cDNA-Fragmente amplifiziert und sequenziert. Mit Hilfe dieser Fragmente wurden sequenzspezifische Primer konstruiert, die für weitere PCR-Experimente eingesetzt wurden. Jeder Primer und jede gewonnene Teilsequenz wurde durch Datenbank-Abgleich und vor weiteren Experimenten u.a. auf eventuell übersehene Vektorsequenzen überprüft. Durch 5'- und 3'-RACE wurde die cDNA-Sequenz zum 5'- und 3'-Ende verlängert. Die so vervollständigte Sequenz der  $\beta$ -Hex-cDNA diente dann als Basis für weiter Sequenzanalysen.

Die so ermittelte Sequenz einer  $\beta$ -Hexosaminidase von aus dem Ciliaten lautet, wie in Figuren 1 aufgeführt. Bei der Sequenz handelt es sich um insgesamt 1836 Basenpaare inkl. 5'- und 3'-nichttranslatierten Bereichen der  $\beta$ -Hexosaminidase mit einem offenen Leseraster ("open reading frame") von 1656 Basenpaaren Länge. Die komplementäre Aminosäuresequenz ist 551 Aminosäuren lang und lautet, wie in Figuren 2 aufgeführt.

- 9 -

Die Sequenz der  $\beta$ -Hexosaminidase besitzt insgesamt 9-Glykosylierungsstellen und enthält ein Signalpeptid, sowie eine pro-Sequenz zur Zielsteuerung des Enzyms durch den Sortiermechanismus der Zelle.

**Patentansprüche**

1. Nucleinsäure kodierend für eine  $\beta$ -Hexosaminidase aus Ciliaten.
2. Nucleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie für eine extrazelluläre  $\beta$ -Hexosaminidase kodiert.
3. Nucleinsäure gemäß Anspruch 1 oder 3, gekennzeichnet durch die Nucleinsäuresequenz in Fig. 1 oder Teile davon, insbesondere mit der Seq. ID No. 1.
4. Ein Protein mit der Aminosäuresequenz der in Figuren 2 angegebenen Abfolge von Aminosäuren.
5. N-terminales Fragment des Proteins gemäß Anspruch 4, insbesondere mit der Sequenz MQKILLITFLLGIALAQ.
6. Nucleinsäure kodierend für das N-terminale Fragment gemäß Anspruch 5, insbesondere ein Fragment der Nucleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4.
7. Verwendung einer Nucleinsäure gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 oder 6 oder Teile davon zur homologen oder heterologen Expression von rekombinanten Proteinen und Peptiden, sowie zur homologen oder heterologen Rekombination ("knock-out", "gene replacement").
8. Ein Verfahren, bei dem die Nucleinsäure gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, 6 oder Teile davon mit den für homologe oder heterologe

- 11 -

Expression üblichen Enhancer, Promotoren, Operatoren, Origins, Terminatoren, Antibiotikaresistenzen oder anderen Nucleinsäuren bzw. DNA-Fragmenten bzw. Sequenzen jeglicher Art von Viroiden, Viren, Bakterien, Archezoen, Protozoen, Pilzen, Pflanzen, Tieren oder Menschen kombiniert wird.

9. Ein Verfahren, bei dem eine Nucleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 oder 6 in einen Vektor, ein Plasmid, ein Cosmid, ein Chromosom oder Minichromosom, ein Transposon, ein IS-Element, eine rDNA oder jede andere Art ringförmiger oder linearer DNA oder RNA eingebaut oder verwendet wird.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figur 1: Die Nucleinsäuresequenz einer sauren Hydrolase aus dem Ciliaten *Tetrahymena*:

-39 -1

cagcagtaataaaaaattctaaatatattgattgtagct

ATG CAA AAG ATA CTT TTA ATT ACT TTC CTT CTT GGA ATA GCT CTC GCT CAA ATT ACT CCT  
60  
GGC GTT GAC CCT ATT TCA GCT AAG GTT ATG CCT AAA CCT AAG AAT TAC ACT TAT GGA GAT  
120  
TTG AGC TTA CTT GTC ACT GAT CCT TGC GGA GTC TCT TAC AGA CCT TCT GTT GGG TCA GGA  
180  
AAA GTA CCC AAC CAT GTC TAT CAA ATT ATT GGA TTC TAC ACT TTG AAT ATT TTC AAT TCT  
240  
AAC GAA AAC TCT TGT GCT ATG TAA AGA GAA TTG TAT AAG AAT GAA ACA ACC ATT GAA AAG  
300  
ATG CGT AGA TTA CAA CAT TCC TAA AAT ATA GTC TTC GAT ATT TTT ATC TAA GAC GCT GCT  
360  
TTG GCC ACT GCA GAC ACA CTC GAA GAC GAA TAT TAT GAT TTA TAA ATT TAT AAT ACC ACA  
420  
TAT TGG AAA TTG ACT GCT AAC AAA TAT GTT GGT TTA CTC CGT GGT TTA GAA ACT TAC TCT  
480  
CAA TTA TTC ACT TAA GAC GAA GAC ACT GAA GAT TGG TAT TTG AAT AAC ATC CCT ATT TCT  
540  
ATT CAA GAT TAA CCT GAC TAC ATC TAC AGA GGT CTT ATG ATA GAT TCA GCC AGA CAT TTC  
600  
TTA TCA GTT GAA ACT ATT TTA AAA ACT ATT GAT TCT ATG TTA TTC AAC AAG TTG AAT GTT  
660  
CTC CAT TGG CAC ATC ACT GAT ACT GAA TCC TTC CCC TTC CCT CTT AAA TCA TTC CCT AAT  
720  
ATT ACT AAA TAT GGA GCC TAC TCT AAG AAG AAA CAA TAC AGC TTC GAA GAC ATT TAA TAC  
780  
ATT GTA GAC TAA GCT CTC AAC AAG GGT ATT TAA GTT ATT CCT GAA GTC GAT TCT CCA GGA  
840  
CAC GCT TTT TCA TGG GCT AGA TCT CCT TAA TTC TCT AGT ATT GGT CTA TTA TGT GAT TAA  
900  
TAT AAT GGA TAG TTA GAC CCA ACA CTA AAT TTA ACT TAC ACT GCT GTT AAG GGT ATT ATG  
960  
GAA GAT ATG AAT ACT TAA TTC TAC ACT GCT AAG TAT GTT CAT TTT GGT GGT GAT GAA GTT

THIS PAGE BLANK (USPTO)



1020

GAA GAA TAA TGC TGG AAT AAA CGC CCT GAA ATT AAG GAA TTC ATG AAT TAA AAT AAC ATC

1080

TCT ACA TAT ACT GAT TTG TAG AAT TAT TAC AGA AAG AAC TAA GTT AAC ATT TGG AAA TCA

1140

ATT AAT GCT ACT AAG CCT GCT ATT TTC TGG GCA GAT TCA AAT ACT TTG AAA TAT GGT CCT

1200

GAT GAT ATT ATT CAA TGG TGG GGA TCT ACT CAT GAT TTT TCT TCA ATC AAA GAT CTT CCT

1260

AAC AAA ATA ATT TTA TCT TTC TAT GAT AAT ACT TAT TTG GAT GTT GGT GAG GGA AAT AGA

1320

TAT GGT GGA AGT TAT GGC AGC ATG TAT AAC TGG GAT GTC TTA AAC TCT TTC AAT CCT AGA

1380

GTT CCT GGA ATT AAG GGT GAA ATT CTT GGT GGC GAA ACA TGC TTA TGG AGT GAA ATG AAT

1440

GAT GAT TCT ACT TAA TTC TAA AGA CTT TGG ACA AGA AAT AGT GCA TTT GCT GAA AGA CTT

1500

TGG AAC ACT GAT GCT GCT AAC AAT GAA ACT TAC AAA ACT AGA GCT TTA GTT AGC AGA ATG

1560

GTC TTT ATG CAA CAC CGT TTA ACT GCT AGA GGA ATC CCT GCT TCT CCT GTA ACA GTT GGT

1620

ATT TGT GAA TAA AAC CTT TCT CTC TGC TAC AAT TGA

1656

ttctaaatataaarattaaataaatattttaagaaatatttttaagaatatttttagtataaaaaactgtattttaattga

1735

taaaaaaaaaatataaatattattattaattgaatttttagctaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

1798

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figur 2: Die Aminosäure-Sequenz einer sauren Hydrolase aus dem Ciliaten *Tetrahymena*:

MQKILLITFL LGIALAQITP GVDPISAKVM PKPKNYTYGD LSLLVTDPCG	50
VSYPSPVSGSG KVPNHVYQII GFYTLNIFNS NENSCAMQR EYKNETTIEK	100
MRRQLQHSQNIVFDIFIQDAA LATADTLEDE YYDLQIYNTT YWKLTANKYV	150
GLLRGLETYS QLFTQDEDETE DWYLNIPIS IQDQPDYIYR GLMIDSARHF	200
LSVETILKTI DSMLFNKLV LHWHITDTES FPFPLKSFPN ITKYGAYSKK	250
KQYSFEDIQY IVDQALNKGI QVIPEVDSPG HAFSWARSPQ FSSIGLLCDQ	300
YNGQLDPTLN LTYTAVKGIM EDMNTQFYTA KYVHFGGDEVEEQCWNKRPE	350
IKEFMNQNNI STYTDLQNYR RKNQVNIWKS INATKPAIFW ADSNTLKYGP	400
DDIIQWWGST HDFSSIKDLP NKIILSFYDN TYLDVGEGNR YGGSYGSMYN	450
WDVLNSFNPRVPGIKGEILG ETCLWSEM N DDSTQFQRLW TRNSAFAERL	500
WNTDAANNET YKTRALVSRM VFMQHRILTAR GIPASPVTVG ICEQNLSLCY	550
N	551

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/01853

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/56 C12N9/14 C12N9/16 C12N9/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	A. TIEDTKE: "Purification and properties of secreted N acetyl-beta-D Hexosaminidase EC-3.2.1.52 of Tetrahymena-thermophila" COMP. BIOCHEM. PHYSIOL. B COMP. BIOCHEM., vol. 75B, no. 2, 1983, pages 239-244, XP000876572	1-4,6
Y	PERGAMON, NEW YORK, US the whole document	1-4,6
X	P. HÜNSELER ET AL.: "Biosynthesis of secreted beta-hexosaminidase in Tetrahymena thermophila. A comparison of the wild type with a secretory mutant" BIOCHEM. J., vol. 252, no. 3, June 1988 (1988-06), pages 837-842, XP000876565	1-4,6
Y	THE BIOCHEM. SOCIETY, LONDON, UK the whole document	1-4,6
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 June 2000

Date of mailing of the international search report

29/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

PCT/EP 00/01853

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	B.F. O'DOWD ET AL.: "Isolation of cDNA clones coding for the beta subunit of human beta-hexosaminidase" PROC. NATL. ACAD. SCI., vol. 82, February 1995 (1995-02), pages 1184-1188, XP002130049 NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON, DC, US; the whole document	1-4,6
Y	J.A. BOOSE ET AL.: "Synthesis of a human lysosomal enzyme, beta-hexosaminidase B, using the baculovirus expression system" PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, vol. 1, no. 2, November 1990 (1990-11), pages 111-120, XP000876587 ACADEMIC PRESS, NY US the whole document	1-4,6
Y	WO 98 50512 A (CONVENTS ANDRE CHRISTIAN ;MOESE ROSA LAURA (US); PROCTER & GAMBLE) 12 November 1998 (1998-11-12) the whole document	1-4,6
Y	WO 98 39459 A (DIEZ GARCIA BRUNO ;MORENO VALLE MIGUEL ANGEL (ES); SALTO MALDONADO) 11 September 1998 (1998-09-11) the whole document	1-4,6
A	M.S. ALAM ET AL.: "Molecular cloning of a gene encoding acid alpha-glucosidase from Tetrahymena pyriformis" J. EUKARYOT. MICROBIOL., vol. 43, no. 4, July 1996 (1996-07), pages 295-303, XP000876569 LAWRENCE, KANS, US cited in the application EMBL Accession no. D83384; the whole document	
A	T. KIY ET AL.: " Production of lysosomal enzymes by continuous high-cell-density fermentation of the ciliate protozoon Tetrahymena thermophila in a perfused bioreactor" ENZYMES AND MICROBIAL TECHNOLOGY, vol. 18, no. 4, March 1996 (1996-03), pages 268-274, XP000876586 ELSEVIER SCIENCE, NY, US the whole document	

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/01853

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	T. KIY ET AL.: "Three pools of lysosomal enzymes in Tetrahymena thermophila" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, vol. 205, no. 2, April 1993 (1993-04), pages 286-292, XP000876578 ACADEMIC PRESS INC., NEW YORK, US the whole document ---	
A	L. RASMUSSEN ET AL.: "Differential increase in activity of acid phosphatase induced by phosphatase starvation in Tetrahymena" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, vol. 201, no. 2, August 1992 (1992-08), pages 522-525, XP000876580 ACADEMIC PRESS INC., NEW YORK, US the whole document ---	
A	T. KIY AND A. TIEDTKE: "Lysosomal enzymes produced by immobilized Tetrahymena thermophila" APPLIED MICROBIOL. AND BIOTECHNOL., vol. 35, no. 1, April 1991 (1991-04), pages 14-18, XP000876574 SPRINGER INTERNATIONAL, NEW YORK, US the whole document ---	
A	M. BENCSATH ET AL.: "The effect of an electric field on the release of hexosaminidase in Tetrahymena" MICROBIOS, vol. 74, no. 301, 1992, pages 227-232, XP000876567 FACULTY PRESS, CAMBRIDGE, UK the whole document ---	
A	Y. BANNO ET AL.: "Secretion heterogeneity of lysosomal enzymes in Tetrahymena pyriformis" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, vol. 170, no. 2, June 1987 (1987-06), pages 259-268, XP000876571 ACADEMIC PRESS INC., NEW YORK, US the whole document ---	
A	P.H. ANDREASEN ET AL.: "Unusual ciliate-specific codons in Tetrahymena mRNA are translated correctly in a rabbit reticulocyte lysate supplemented with a subcellular fraction from Tetrahymena" BIOCHEM. J., vol. 244, no. 2, June 1987 (1987-06), pages 31-335, XP000876564 THE BIOCHEM. SOCIETY, LONDON, UK the whole document -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/01853

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9850512 A	12-11-1998	NONE	
WO 9839459 A	11-09-1998	ES 2127697 A	16-04-1999
		AU 6101198 A	22-09-1998
		CA 2253250 A	11-09-1998
		CN 1219200 T	09-06-1999
		CZ 9803535 A	17-02-1999
		LT 98152 A, B	25-06-1999
		LV 12264 A	20-04-1999
		PL 329722 A	12-04-1999
		ZA 9801896 A	14-09-1998



# INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01853

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/56 C12N9/14 C12N9/16 C12N9/24

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	A. TIEDTKE: "Purification and properties of secreted N acetyl-beta-D Hexosaminidase EC-3.2.1.52 of Tetrahymena-thermophila" COMP. BIOCHEM. PHYSIOL. B COMP. BIOCHEM., Bd. 75B, Nr. 2, 1983, Seiten 239-244, XP000876572	1-4,6
Y	PERGAMON, NEW YORK, US das ganze Dokument	1-4,6
X	P. HÜNSELER ET AL.: "Biosynthesis of secreted beta-hexosaminidase in Tetrahymena thermophila. A comparison of the wild type with a secretory mutant" BIOCHEM. J., Bd. 252, Nr. 3, Juni 1988 (1988-06), Seiten 837-842, XP000876565	1-4,6
Y	THE BIOCHEM. SOCIETY, LONDON, UK das ganze Dokument	1-4,6

---  
-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Juni 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

29/06/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	B.F. O'DOWD WT AL.: "Isolation of cDNA clones coding for the beta subunit of human beta-hexosaminidase" PROC. NATL. ACAD. SCI., Bd. 82, Februar 1995 (1995-02), Seiten 1184-1188, XP002130049 NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON, DC, US; das ganze Dokument	1-4,6
Y	J.A. BOOSE ET AL.: "Synthesis of a human lysosomal enzyme, beta-hexosaminidase B, using the baculovirus expression system" PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, Bd. 1, Nr. 2, November 1990 (1990-11), Seiten 111-120, XP000876587 ACADEMIC PRESS, NY US das ganze Dokument	1-4,6
Y	WO 98 50512 A (CONVENTS ANDRE CHRISTIAN ; MOESE ROSA LAURA (US); PROCTER & GAMBLE) 12. November 1998 (1998-11-12) das ganze Dokument	1-4,6
Y	WO 98 39459 A (DIEZ GARCIA BRUNO ; MORENO VALLE MIGUEL ANGEL (ES); SALTO MALDONADO) 11. September 1998 (1998-09-11) das ganze Dokument	1-4,6
A	M.S. ALAM ET AL.: "Molecular cloning of a gene encoding acid alpha-glucosidase from Tetrahymena pyriformis" J. EUKARYOT. MICROBIOL., Bd. 43, Nr. 4, Juli 1996 (1996-07), Seiten 295-303, XP000876569 LAWRENCE, KANS, US in der Anmeldung erwähnt EMBL Accession no. D83384; das ganze Dokument	
A	T. KIY ET AL.: " Production of lysosomal enzymes by continous high-cell-density fermentation of the ciliate protozoon Tetrahymena thermophila in a perfused bioreactor" ENZYMES AND MICROBIAL TECHNOLOGY, Bd. 18, Nr. 4, März 1996 (1996-03), Seiten 268-274, XP000876586 ELSEVIER SCIENCE, NY, US das ganze Dokument	

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	T. KIY ET AL.: "Three pools of lysosomal enzymes in Tetrahymena thermophila" EXPRIMENTAL CELL RESEARCH, Bd. 205, Nr. 2, April 1993 (1993-04), Seiten 286-292, XP000876578 ACADEMIC PRESS INC., NEW YORK, US das ganze Dokument ---	
A	L. RASMUSSEN ET AL.: "Differential increase in activity of acid phosphatase induced by phosphatase starvation in Tetrahymena" EXPRIMENTAL CELL RESEARCH, Bd. 201, Nr. 2, August 1992 (1992-08), Seiten 522-525, XP000876580 ACADEMIC PRESS INC., NEW YORK, US das ganze Dokument ---	
A	T. KIY AND A. TIEDTKE: "Lysosomal enzymes produced by immobilized Tetrahymena thermophila" APPLIED MICROBIOL. AND BIOTECHNOL., Bd. 35, Nr. 1, April 1991 (1991-04), Seiten 14-18, XP000876574 SPRINGER INTERNATIONAL, NEW YORK, US das ganze Dokument ---	
A	M. BENCSATH ET AL.: "The effect of an electric field on the release of hexosaminidase in Tetrahymena" MICROBIOS, Bd. 74, Nr. 301, 1992, Seiten 227-232, XP000876567 FACULTY PRESS, CAMBRIDGE, UK das ganze Dokument ---	
A	Y. BANNO ET AL.: "Secretion heterogeneity of lysosomal enzymes in Tetrahymena pyriformis" EXPRIMENTAL CELL RESEARCH, Bd. 170, Nr. 2, Juni 1987 (1987-06), Seiten 259-268, XP000876571 ACADEMIC PRESS INC., NEW YORK, US das ganze Dokument ---	
A	P.H. ANDREASEN ET AL.: "Unusual ciliate-specific codons in Tetrahymena mRNA are translated correctly in a rabbit reticulocyte lysate supplemented with a subcellular fraction from Tetrahymena" BIOCHEM. J., Bd. 244, Nr. 2, Juni 1987 (1987-06), Seiten 31-335, XP000876564 THE BIOCHEM. SOCIETY, LONDON, UK das ganze Dokument -----	

# INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01853

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
W0 9850512	A	12-11-1998	KEINE		
W0 9839459	A	11-09-1998	ES	2127697 A	16-04-1999
			AU	6101198 A	22-09-1998
			CA	2253250 A	11-09-1998
			CN	1219200 T	09-06-1999
			CZ	9803535 A	17-02-1999
			LT	98152 A, B	25-06-1999
			LV	12264 A	20-04-1999
			PL	329722 A	12-04-1999
			ZA	9801896 A	14-09-1998